

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591046

研究課題名(和文) 心筋症における心筋蛋白遺伝子発現と運動耐容能評価による新規病態解明

研究課題名(英文) Impact of myocardial gene expression and exercise capacity in cardiomyopathy

研究代表者

平敷 安希博(Hirashiki, Akihiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：10418741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症において、心肺運動負荷試験による運動耐容能の評価は、肺高血圧症の合併を見出すことができる。また、肺高血圧症を合併した拡張型心筋症は、比較的短期間で心臓死を起こす独立した予後規定因子であったことから、心肺運動負荷試験における運動耐容能の評価は、重要な非侵襲的生理学的検査として、重症心不全においても積極的に行うべきであることを示した。拡張型心筋症において、心筋遺伝子発現であるCaハンドリングやミトコンドリア関連蛋白と心筋拡張障害との関連を報告した。

研究成果の概要(英文)：The presence of pulmonary hypertension (PH) was independently associated with an increased incidence of cardiac death in ambulatory patients with dilated cardiomyopathy (DCM). %PPeak VO₂ was strongly associated with the presence of PH in patients with DCM. Taken together, these findings indicate that CPX variables could be important for diagnosing PH in patients with DCM. In patients with DCM, LGE moderately correlated with collagen volume fraction (CVF). CVF also correlated with impaired left ventricular (LV) relaxation and the down-regulation of mitochondrial enzyme gene expression. Positive late gadolinium enhancement (LGE) on cardiac magnetic resonance was more strongly associated with adverse LV remodeling than was CVF determined by endomyocardial biopsy (EMB). Positive LGE may provide useful information, not only about myocardial fibrosis, but also about myocardial mitochondrial dysfunction.

研究分野：循環器内科

キーワード：運動耐容能 心肺運動負荷試験 拡張型心筋症

1. 研究開始当初の背景

(1)心筋生検から直接的に得られる情報と、病状を直接反映する運動耐容能の評価指標との関連を調べ、統合的な心不全の病態解明を行っている研究グループは世界的に少ない。

(2)心肺運動負荷試験 (Cardiopulmonary exercise testing : CPX) は、労作時息切れを最も客観的に評価でき、再現性にも優れ、予後予測や治療効果判定を可能とする非侵襲的生理検査法である。中でも PeakVO2 は心不全の予後予測因子として確立されている。しかしながら、欧米と比較し本邦では、CPX を治療効果判定に用いている施設は極めて少ない。

(3)しかし、これまで CPX 指標と心筋病理との直接的関連性は示されておらず、強力な予後予測因子である CPX 指標が心不全の病態を評価できるかは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、拡張型ならびに肥大型心筋症 (DCM, HCM) において、予後規定因子である運動耐容能を心筋病理の観点から明らかにすることである。

3. 研究の方法

拡張型心筋症・肥大型心筋症に対し、血液生化学検査、心臓超音波検査、睡眠時無呼吸検査、心肺運動負荷検査、心臓 MRI、心臓カテーテル検査、左室圧測定: 左室内の pig-tail 型 micromanometer により左室内圧を記録し、左室心筋収縮 (LVdP/dtmax)・弛緩 (tau) 特性を測定、心筋生検を行った。

a) 血液生化学検査:

BNP, トロポニン T, インドキシル硫酸など予後予測探索バイオマーカー

b) 心臓超音波検査:

左室駆出率などの一般的な評価に加え、e', E/e' の拡張能評価, TDI (strain, strain rate), dyssynchrony の有無, 心筋ねじれの評価。

c) 睡眠時無呼吸検査:

簡易スクリーニング検査。

d) 心肺運動負荷検査:

Peak VO₂, VE/VCO₂ slope などの確立された予後予測指標に加え、Exercise Oscillatory Ventilation, Heart rate recovery, 運動時血圧などの新たなパラメータを検討。

e) 心臓 MRI:

T1, T2 強調画像、遅延造影 MRI、シネ MRI にて、二次性心筋症の鑑別予後調査

f) 心筋生検標本の解析:

臨床検査チームにより採取された心筋生検標本 (各疾患それぞれ 4 標本) を心筋細胞内 Ca²⁺ 動態関連 (SERCA2, ryanodine 受容体, phospholamban) mRNA を解析するため cDNA として -80 度で保存し、定量的 RT-PCR 法にて行った。病理標本から collagen volume

fraction を計測した。アポトーシスを評価するため TUNEL 染色を行う。Ca ハンドリング蛋白の免疫病理組織検査を行う。免疫染色用に OCT コンパウンドを用いて心筋生検サンプルを保護し、-80 度で保存した。

g) データ解析:

各チームで、独自で行われているデータベースを統合し、臨床検査データ、分子生物学的データ、病理組織学的データを解析し、分子生物学、病理組織から得られる心筋障害の重症度と臨床検査データへの関連解析を進めた。

f) 心イベント追跡

検査を行った患者は、可能な範囲で当院に外来通院し、確実な追跡調査を行う体制を整え、心不全入院、失神、心臓死などの心血管イベントが出現しないか予後調査を行う。

4. 研究成果

2012 年度は、うっ血性心不全患者における日常生活の新規アンケート指標である (PMADL-8) が病状把握に有用であることを報告し、慢性心不全患者における疾患重症度と PMADL-8 および PeakVO2 との関係について報告した。(図 1)

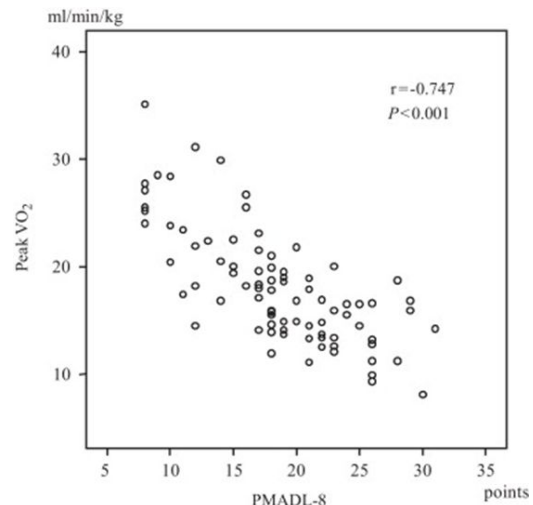


図 1

DCM における運動終了直後の Heart rate recovery (HRR) を評価することにより、副交感神経の活性の指標が心血管イベント発症の独立した予後予測因子であることを報告した。(図 2)

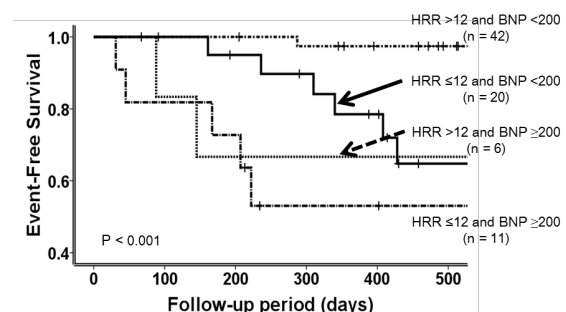


図 2

血液バイオマーカーにおける視点からも考察し、DCM において尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸 (IS) が左室拡張能と心イベント発症の予後予測に関連することを報告した。(図 3)

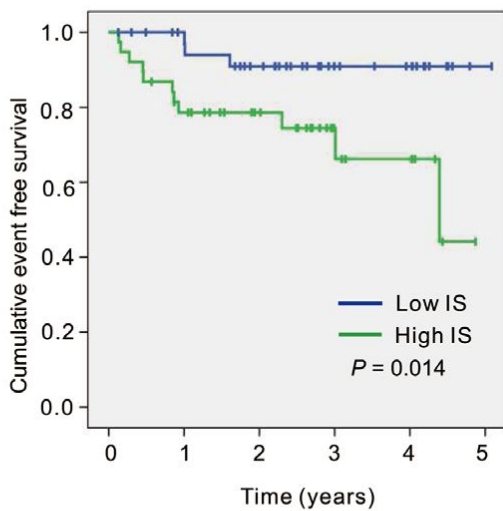


図 3

2013 年度は、HCM において、高感度トロポニン T と I を末梢血、大動脈血、冠状静脈血から採取・測定し、その値が心筋障害の程度や血行動態、あるいは心筋遺伝子発現 Ca ハンドリングやミトコンドリア関連蛋白との関連を報告した。トロポニンと心筋症に関しては、論文報告が少ない。

また、DCM において、心臓 MRI による遅延造影 MRI の繊維化と心筋生検の繊維化は相関を認めた (図 4)

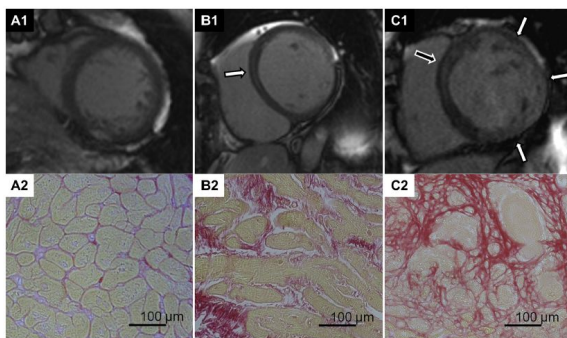


図 4

DCM における心筋遺伝子発現 Ca ハンドリングである SERCA2 やミトコンドリア関連蛋白である COX5B, NDUFB3, α -KGHD が心筋繊維化を示す LGE (遅延造影) 陽性では、陰性と比較し、有意に障害されていた。(図 5)

また、LGE 陽性の因子として、重回帰分析を行ったところ、CVF (心筋線維化量) と LVdP/dtmin (左室弛緩能) の指標が規定因子

であることを示し (表 1), 心筋拡張障害ならびに心臓 MRI の delayed enhancement との関連が強いことを報告した。

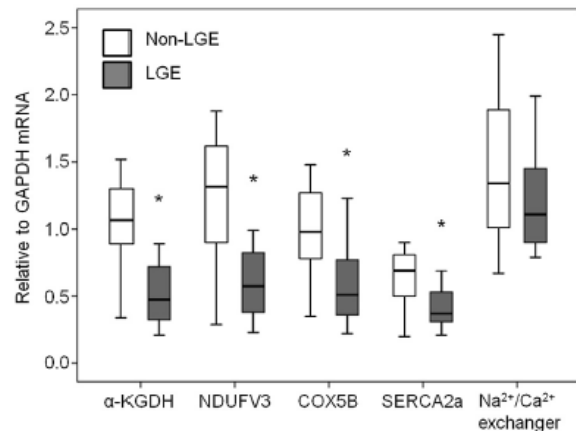


図 5

Variable	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	Unadjusted OR (95% CI)	P Value	Adjusted OR (95% CI)	P Value
CVF (%)	1.29 (1.08-1.55)	.006	1.22 (1.00-1.47)	.046
NVHA functional class	4.26 (1.54-11.8)	.005		
BNP (pg/mL), per 10-pg/mL increments	1.04 (1.00-1.09)	.041		
LVEF on CMR (%), per 10% increments	0.61 (0.37-1.00)	.049		
Cardiac index (L min ⁻¹ m ⁻²), per 0.1-L min ⁻¹ m ⁻² increments	0.90 (0.81-0.99)	.033		
Systolic BP (mm Hg), per 10-mm Hg increments	0.71 (0.53-0.94)	.017		
LVdP/dt _{max} (mm Hg/s), per 100-mm Hg/s increments	1.53 (1.18-1.97)	.001	1.50 (1.11-2.02)	.008

表 1

DCM において、薬物負荷の心筋予備能と運動負荷の心筋予備能を比較検討した。運動負荷と交感神経刺激薬による薬物負荷による比較した研究は無い。

ドパミン負荷によって評価した左室収縮予備能と peak VO₂ は有意な相関を示し、その相関は負荷量の増加とともに強くなった。左室収縮予備能は、左室駆出率、BNP、E/e' と比較し、peak VO₂ に対し独立した規定因子であった。(表 2)

ドパミンを負荷した LVdP/dt_{max} の変化でみる左室収縮予備能は、VE/VC0₂ slope と比べ、peak VO₂ に強い相関を認めた。(図 6)

Parameter	peak VO ₂		
	β	(95% CI)	p-value
Δ LV dP/dt _{max} (10 μ g kg ⁻¹ min ⁻¹)	0.430	(0.012 - 0.086)	0.011
BNP	-0.421	(-0.017 - -0.002)	0.010
LVEF	-0.251	(-0.288 - 0.039)	0.131
E/Ea ratio	-0.183	(-0.272 - 0.059)	0.201

表 2

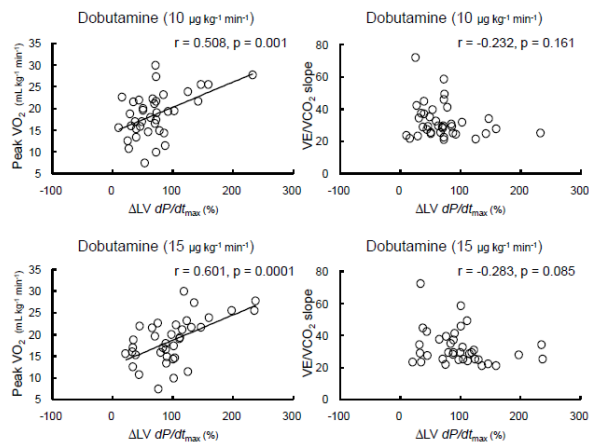


図 6

2014年度は、DCMにおいて心臓MRIの心筋遅延造影陽性すなわち左室繊維化・拡張障害があることと運動耐容能の指標としてCPXのpeakVO₂ <18 mL/kg/minを組み合わせた指標は、強力な予後予測因子であった。(図7, 8)

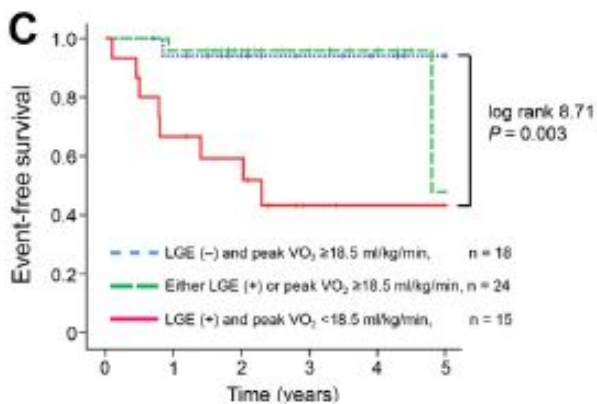


図 7

Fig 4

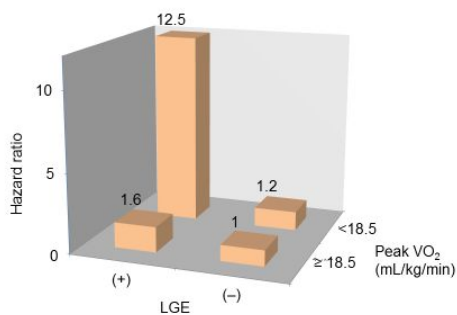


図 8

平均肺動脈圧 25 mmHg 以上を肺高血圧症と定義するが、左心系疾患においても肺高血圧症の合併は予後不良とされている。左心系疾患といっても弁膜症、虚血性心疾患など様々な基礎疾患があるため、本研究では、DCM に絞って、肺高血圧症の有無を血行動態、予後への影響について検討した。

肺高血圧合併した DCM は全体の 12% で、PCWP と mPAP の相関図は下のようであった。(図 9)

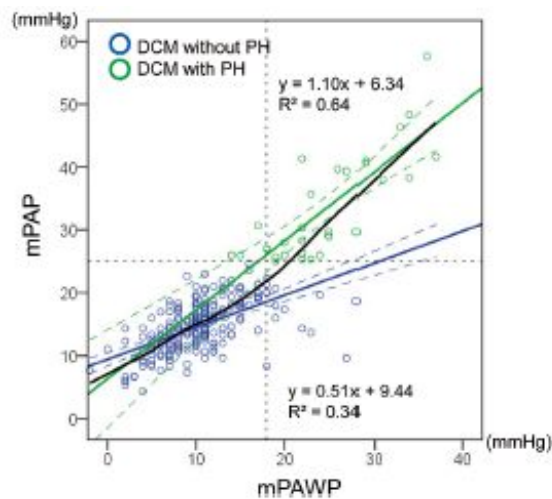


図 9

肺高血圧を合併する DCM は、合併していない群と比較し、血漿 BNP 値、肺動脈楔入圧 (PCWP)、安静時心拍数は有意に高く (全て $P < 0.001$)、一方、心拍量と左室駆出率は有意に低かった ($P = 0.002$, $P < 0.001$)。心イベントの発症に関し、肺高血圧合併 DCM 群において有意に多かった (ログラंक検定、 $P = 0.021$)。(図 10)

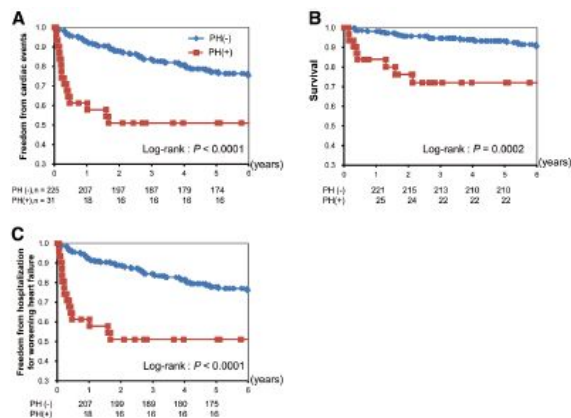


図 10

心イベントの発症に関し多変量 Cox 比例ハザード解析を施行した結果、心不全入院については PCWP および 左室弛緩能の T1/2 が独立した規定因子となったが、心臓死については mPAP 25mmHg と左室収

縮末期容積係数が独立した規定因子であった。(表3)

	Wald	Exp (B)	95% CI	P value
Cardiac death				
mPAP ≥ 25 (mmHg)	4.739	0.232	(0.062-0.864)	0.029
LVESVI (ml/m ²)	4.186	1.031	(1.001-1.061)	0.041
LVEDVI (ml/m ²)	3.844	0.975	(0.951-1.000)	0.050
Hospitalization for worsening HF				
PAWP (mmHg)	6.610	1.066	(1.015-1.120)	0.010
T ₁₀₀ (ms)	3.957	1.038	(1.001-1.077)	0.047
LVEF (%)	3.341	0.978	(0.954-1.002)	0.068
Cardiac death and hospitalization for worsening HF				
LVESVI (ml/m ²)	7.356	1.028	(1.008-1.049)	0.007
PAWP (mmHg)	4.536	1.057	(1.004-1.113)	0.033
T ₁₀₀ (ms)	4.063	1.040	(1.001-1.080)	0.043
LVEDVI (ml/m ²)	3.479	0.984	(0.967-1.001)	0.062

表 3

血行動態パラメーターおよび心イベント発症に関して不良であった。肺高血圧の存在は、軽中等症 DCM においても特に心臓死の発症に寄与する因子と考えられた。

心筋症だけでなく、重症右心不全の代表疾患である肺動脈性肺高血圧症において、CPX による右心不全疾患に対するボセンタンの治療効果判定の有用性を報告した。肺動脈性肺高血圧症は、3 ヶ月間のボセンタンにより PeakVO₂ は有意に改善したが、慢性血栓性肺高血圧症は、PeakVO₂ は改善しなかったが、運動終了時の呼気終末二酸化炭素分圧 (PETCO₂) が有意に改善した。(図 9)

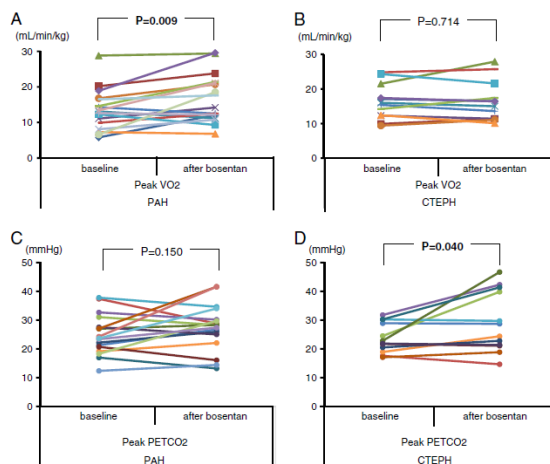


図 9

2015 年度は、自律神経や睡眠時無呼吸症候群と心不全の関連について報告し (Shimazu, Hirashiki et al. J Cardiol. 2015), 腹部大動脈瘤の術後患者における早期退院の規定因子は、術前の運動習慣にあることを報告した。また DCM において肺高血圧の有無は、CPX の指標で見出すことができることを示し、中でも %PPeakVO₂ が最も良い指標であることを報告した。(図 10)

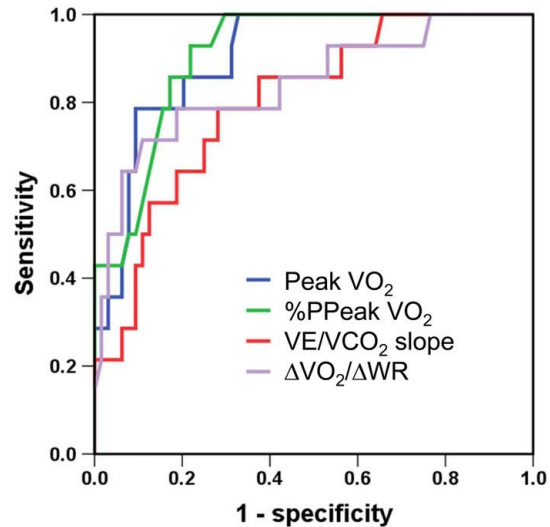


図 10

Table 3. Binary Logistic Analysis for the Detection of Pulmonary Hypertension

Analysis	Univariate				Multivariate			
	Wald	OR	95%CI	P	Wald	OR	95%CI	P
Peak VO ₂ (mL/kg/min)	15.1	0.672	0.550-0.821	<0.001				
%PPeak VO ₂ (%)	14.0	0.902	0.854-0.952	<0.001	6.52	0.892	0.818-0.974	0.011
Peak VO ₂ /HR ratio	7.13	0.744	0.600-0.924	0.008				
VE/VC ₀₂ slope	11.6	1.136	1.056-1.222	0.001				
ΔVO ₂ /ΔWR	13.9	0.609	0.470-0.790	<0.001				
Peak HR (bpm)	3.81	0.979	0.959-1.000	0.051				
Peak systolic BP (mmHg)	6.62	0.976	0.958-0.994	0.010				
EOV	0.52	1.023	0.726-1.370	0.528				
Rest P _{ET} CO ₂ (mmHg)	6.99	0.862	0.772-0.962	0.008				
Peak W (watts)	0.47	0.993	0.974-1.013	0.490				

表 4

本研究は、DCM に関して、従来の心筋特性の指標である Swan-Ganz カテーテルによる血行動態指標が、CPX による運動時の生理学的指標と強い関連があることを示した。2014 年に、肺高血圧の合併が心臓死に影響が強いことをコックス比例ハザード解析により示しており、(Hirashiki, et al. Circ J. 2014), 間接的には、CPX の指標が、心不全の悪化や突然死を含めた心臓死などの心血管イベントに非常に意義が強いことを示した結果として、これらは合致した結果である。

これらの研究から、心筋症において、CPX による運動耐容能の評価および心筋病理から得られる遺伝子発現は関連しており、予後予測の因子としても有用であることを示した。本研究期間で、CPX による各種検査指標、PeakVO₂, VE/VC₀₂slope, Heart rate recovery, PETCO₂, %PPeakVO₂ などの指標の有用性を示すことができた。当グループにおいて、左心不全、右心不全を問わず、運動耐容能評価の治療効果判定および予後予測の意義を継続的に報告できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1, Hirashiki A, Adachi S, Nakano Y, Kamimura Y, Shimokata S, Takeshita K, Murohara T, and Kondo T. Effects of bosentan on peripheral endothelial function in patients with pulmonary arterial hypertension or chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* 2016;6(2):168-173. 査読有

2, Hirashiki A, Kondo T, Okumura T, Kamimura Y, Nakano Y, Fukaya K, Sawamura A, Morimoto R, Adachi S, Takeshita K, Murohara T. Cardiopulmonary Exercise Testing as a Tool for Diagnosing Pulmonary Hypertension in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Annals of Noninvasive Electrocardiology.* 2016 in press 査読有

3, Shimazu S, Hirashiki A, Kamimura Y, Nakano Y, Adachi S, Kondo T, Murohara T. Assessment of respiratory disturbance index determined with a non-restrictive monitor and of autonomic nervous system parameters in heart failure patients: A pilot study. *J Cardiol.* 2015 Sep;66(3):218-23 査読有

4, Yamada T, Hirashiki A, Okumura T, Adachi S, Shimazu S, Shimizu S, Morimoto R, Takeshita K, Naganawa S, Kondo T, Murohara T. Prognostic Impact of Combined Late Gadolinium Enhancement on Cardiovascular Magnetic Resonance and Peak Oxygen Consumption in Ambulatory Patients with Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2014 Nov;20(11):825-32. 査読有

〔学会発表〕(計 37 件)

1, Hirashiki A, Shimokata S, Kamimura Y, Nakano Y, Adachi S, Okumura T, Takeshita K, Murohara T, Kondo T. Health-care quality of life over time during sequential combination therapy in pulmonary arterial hypertension. 2016年3月20日 第80回日本循環器学会学術集会 宮城県仙台市 仙台国際会議場

2, Hirashiki A, Shimokata S, Kamimura Y, Nakano Y, Adachi S, Okumura T, Takeshita K, Murohara T, Kondo T. Circulatory power and exercise ventilatory power during exercise over time during sequential combination therapy in pulmonary arterial hypertension. 2016年3月20日 第80回日本循環器学会学術集会 宮城県仙台市 仙台国際会議場

3, 平敷安希博, 近藤隆久, 下方茂毅, 上村佳大, 中野嘉久, 足立史郎, 室原豊明. ボセンタンによる末梢血管内皮機能の効果 -

肺動脈性肺高血圧症と慢性血栓塞栓性肺高血圧症での比較-. 2015年12月10日 第23回日本血管生物医学会学術集会 兵庫県神戸市 神戸国際会議場

4. Kamimura Y, Hirashiki A, Shimokata S, Nakano Y, Adachi S, Takeshita K, Murohara T, Kondo T. Effects of bosentan on endothelial function by flow-mediated vasodilation in patients with pulmonary arterial hypertension compared to chronic thromboembolic pulmonary hypertension. 2015年9月1日 ESC congress 2015 London - イギリス

5. Hirashiki A, Shimokata S., Kamimura Y, Nakano Y, Adachi S, Okumura T, Takeshita K, T Murohara, Kondo T. Circulatory power and exercise ventilatory power during exercise over time during sequential combination therapy in pulmonary arterial hypertension. 2015年9月1日 ESC congress 2015 London - イギリス

〔図書〕(計 3 件)

1. 平敷安希博, 室原豊明. 南江堂 心不全患者に寄り添う 包括的心臓リハビリテーションを極める 心不全に対する心臓リハビリテーションのエビデンス 編集 絹川真太郎 2016.3.5 160 (p21-27)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平敷 安希博 (HIRASHIKI AKIHIRO)

名古屋大学大学院医学系研究科・寄附講座 助教

研究者番号: 10418741

(2)研究分担者

竹下 享典 (TAKESHITA KYOSUKE)

名古屋大学 医学部附属病院・講師

研究者番号: 70444403

坂東 泰子 (BANDO YASUKO)

名古屋大学 医学部附属病院・講師

研究者番号: 60452190

室原 豊明 (MUROHARA TOYOAKI)

名古屋大学 大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90299503